

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ – ВАЖНАЯ ПРИЧИНА УСИЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЙ ДИЛАТАЦИИ И СНИЖЕНИЯ АДРЕНОРЕАКТИВНОСТИ КОЛЬЦА АОРТЫ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

ЛАЗУКО С.С., МЕДВЕДЕВ М.Н., БЕЛЯЕВА Л.Е.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №2. – С. 44-52.

INDUCIBLE NO-SYNTHASE HYPEREXPRESSION AS AN IMPORTANT CAUSE OF RATS' AORTIC RING ENDOTHELIUM-DEPENDENT DILATATION ENHANCEMENT AND ADRENOREACTIVITY REDUCTION IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

LAZUKO S.S., MEDVEDEV M.N., BELYAEVA L.E.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(2):44-52.

Резюме.

Цель исследования – определить вклад индуцибельной NO-синтазы в механизмы нарушения эндотелийзависимой вазодилатации и адренореактивности изолированного кольца аорты крыс при экспериментальном сахарном диабете.

Материал и методы. Эксперименты выполнялись на препаратах колец аорты, изолированных из организмов крыс-самок с экспериментальным сахарным диабетом, который моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг), разведенного в цитратном буфере (pH 4,5). Препараты кольца аорты, сокращавшиеся в изометрическом режиме, перфузировали раствором Кребса-Хензеляйта, аэрированным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Адренореактивность оценивали по ответной реакции кольца аорты на α 1-адренин-стимулятор фенилэфрин, который добавляли в перфузионный раствор в концентрации от 10⁻¹⁵ до 10⁻⁶М. Эндотелийзависимую дилатацию вызывали ацетилхолином в возрастающих концентрациях от 1×10⁻¹⁰ до 3×10⁻⁵М. Для выяснения роли iNOS в механизмах поддержания тонуса кольца аорты в перфузионный раствор добавляли ее высокоселективный блокатор S-метилизотиомочевину (S-MT) (10 мкМ, Sigma, США). Гистологические срезы препаратов кольца аорты исследовали иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител (Abscam, UK) к iNOS (1:75) и eNOS (1:150). Интерпретацию результатов проводили полуколичественным методом, оценивая интенсивность окрашивания препарата.

Результаты. Было продемонстрировано, что в группе животных с экспериментальным сахарным диабетом увеличение выраженности эндотелийзависимой релаксации и снижение адренореактивности кольца аорты вызваны гиперпродукцией монооксида азота, продуцируемого iNOS. При этом было обнаружено снижение экспрессии фермента eNOS и увеличение iNOS в эндотелии препарата аорты.

Заключение. Монооксид азота, продуцируемый iNOS, играет ключевую роль в снижении адренореактивности и увеличении ацетилхолин-индуцированного расслабления изолированных колец аорты крыс после экспериментального сахарного диабета.

Ключевые слова: индуцибельная NO-синтаза, сахарный диабет, эндотелийзависимая вазодилатация, адренореактивность.

Abstract.

Objectives. To determine the contribution of the inducible NO-synthase to mechanisms of isolated rats' aortic rings

endothelium-dependent vasodilatation and adrenoreactivity disorders in experimental diabetes mellitus.

Material and methods. Experiments were performed on rings of the aorta isolated from the bodies of female rats with experimental diabetes mellitus, that was modelled by means of the single intraperitoneal injection of streptozocin (50 mg/kg) dissolved in the citrate buffer (pH 4.5). Aortic rings specimens contracted in the isometric regimen were perfused with Krebs-Henseleit solution, aerated with carbogen (95% of O₂ and 5% of CO₂). Adrenoreactivity of aortic rings was assessed by their response to α 1-adrenomimetic phenylephrine, that was added to the perfusion solution in increasing concentrations (from 10⁻¹⁵ up to 10⁻⁶M). To investigate endothelium-dependent aortic vasodilatation acetylcholine was infused in the perfusion bath at the doses from 1×10⁻¹⁰ up to 3×10⁻⁵M. To establish the role of iNOS in the mechanisms of aortic tone regulation high-selective enzyme blocker S-methylisothiourea (S-MT) was administered (10 mM, Sigma, USA). Immunohistochemical study of histological sections of aorta rings specimens was carried out with polyclonal antibodies (Abcam, UK) to iNOS (1:75) and eNOS (1:150). The obtained results were interpreted with the help of semiquantitative method assessing the intensity of slide mounts staining.

Results. It was shown that experimental diabetes mellitus produces pronounced endothelium-dependent aortic ring vasodilatation and diminished vasoconstriction due to nitric oxide hyperproduction mainly by iNOS. Moreover, decreased level of the eNOS expression and iNOS hyperexpression in endothelial cells of the aorta were detected.

Conclusions. Nitric monoxide, produced by iNOS, plays a key role in the adrenoreactivity reduction and enhancement of acetylcholine-induced vasodilatation of aortic rings isolated from rats after experimental diabetes mellitus.

Key words: *inducible NO-synthase, diabetes mellitus, endothelium-dependent vasodilatation, adrenoreactivity.*

Современные исследования показали, что в сердце и его сосудах экспрессируются все три изоформы NO-синтазы (NOS) – эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS). Оксид азота, образующийся теми изоформами NO-синтазы, которые экспрессированы в конституциональных условиях (eNOS, nNOS), вызывает вазодилатацию, подавляет агрегацию тромбоцитов, способствует открытию K_{ATP}-каналов, регулируя тем самым коронарный кровоток [1]. Известно, что eNOS локализуется в caveолах эндотелиоцитов [2]. Монооксид азота, продуцируемый этой изоформой NO-синтазы, активирует гуанилатциклазу и увеличивает образование вторичного посредника цГМФ, который посредством активации цГМФ-зависимых протеинкиназ обеспечивает поступление ионов кальция в саркоплазматический ретикулум с уменьшением его содержания в саркоплазме сосудистых гладкомышечных клетках и их расслабление. Оксид азота, образуемый эндотелиальной NO-синтазой, противодействует вазоконстрикции, опосредуемой стимуляцией α 1-адренорецепторов. В результате происходит снижение α 1-адренореактивности и сократительной функции гладких миоцитов.

Традиционно считается, что в эндотелиоцитах и сосудистых гладкомышечных клетках iNOS синтезируется при патологических состояниях. В этом случае NO продуцируется в количествах, тысячекратно превышающих его нормальную продукцию, что является одним из

проявлений дисфункции эндотелия кровеносных сосудов. Полагают также, что важными механизмами дисфункции эндотелия при сахарном диабете 1-го типа может быть как снижение экспрессии гена, кодирующего eNOS, так и уменьшение активности фермента eNOS [3]. Более тонкое понимание особенностей дисфункции эндотелия кровеносных сосудов позволит оптимизировать терапевтическую стратегию, направленную на предотвращение и коррекцию сосудистых осложнений у пациентов с сахарным диабетом.

Цель исследования – определить вклад индуцибельной NO-синтазы в механизмы нарушения эндотелийзависимой вазодилатации и адренореактивности изолированного кольца аорты крыс при экспериментальном сахарном диабете.

Материал и методы

Опыты на животных проводили в соответствии с протоколом по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденным Комиссией УО «ВГМУ». Животные были разделены на группы: 1-ая – контрольная («Контроль», n=8); 2-ая – животные со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом («Сахарный диабет», n=8), развивающимся в результате повреждения и гибели β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Стрептозоцин вводили однократно внутривентрально в дозе 50 мг/кг массы тела животного. В качестве растворителя стрептозоцина использовали цитратный

буфер (рН 4,5). Интактным животным однократно внутрибрюшинно вводили равное количество цитратного буфера, чтобы исключить его воздействие на изучаемые показатели. Поскольку различий в изучаемых показателях группы «Контроль» и группы «Интактные животные» не наблюдалось, сравнение показателей в дальнейшем проводили с контрольной группой. Спустя 14 дней при помощи глюкометра Finetest (Корея) у животных измеряли уровень глюкозы в крови хвостовой вены. Концентрацию глюкозы в моче определяли с помощью набора Глюко-Альбу-рН-Уротест УП «Унитехпром БГУ». Содержание гликозилированного гемоглобина определяли методом быстрого разделения на ионообменной смоле при помощи набора реагентов для определения гликозилированного гемоглобина «Анализ плюс».

Крыс наркотизировали уретаном (0,1 г/100 г веса тела животного, внутрибрюшинно). Препараты аорты нарезали шириной по 3 мм из средней части грудной аорты. Приготовленный препарат погружали в ванночку объемом 12 мл. Для перфузии препарата кольца аорты использовали раствор Кребса-Хензеля (рН 7,4, $t=37^{\circ}\text{C}$, аэрированный карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2)). В течение 2-часового периода стабилизации напряжения сегмента аорты каждые 15 минут меняли раствор, омывающий препарат. Для перфузии использовали прибор Schuler Organ bath Type 809 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ). Аортальные кольца сокращались в изометрическом режиме (датчик силы F30 Type372 (Hugo Sachs Elektronik, ФРГ)). Вазоконстрикцию сегмента аорты изучали путем введения в перфузионный раствор $\alpha 1$ -адреностимулятора фенилэфрина в нарастающей концентрации от 10^{-15} до 10^{-6}M . После максимального предсокращения кольца аорты и стабилизации напряжения в раствор для перфузии добавляли ацетилхолин в концентрации от 1×10^{-10} до $3 \times 10^{-5}\text{M}$. Вклад NO, образуемого iNOS, в механизмы регуляции тонуса кольца аорты определяли, используя высокоселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы – S-метилизотиомочевину (S-MT) (10 мкМ, Sigma, США). Чувствительность препарата кольца аорты к фенилэфрину или ацетилхолину оценивали, определяя EC_{50} , которая представляет собой концентрацию исследуемого вещества, вызывающую полумаксимальное сокращение или расслабление, соответственно, изолированного кольца аорты крыс [4].

Иммуногистохимия. После фиксации препарата грудной аорты в 10% растворе нейтраль-

ного забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы аорты толщиной 4-6 мкм. Для гистологического исследования препараты окрашивали гематоксилином и эозином (для обзорной микроскопии), а затем иммуногистохимически с использованием поликлональных антител к iNOS (1:75) и eNOS (1:150) (Abcam, UK). В качестве визуализирующей системы использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, UK), включающую комплекс вторичных антител и диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксин для докраски препаратов. Иммуногистохимическое окрашивание исследуемого препарата осуществляли при помощи роботизированной станции – MAX Processing Module (производства Biosystems Melbourne Pty Ltd, Австралия) в соответствии с протоколами и рекомендациями Leica. После автоматизированного окрашивания препараты промывали под проточной водой, обезвоживали в спирте и просветляли в карбол-ксилоле и ксилоле. Затем срезы помещали в среду «Bio Mount» («Bio Optica», Milano) и накрывали покровным стеклом. Интерпретацию полученных данных проводили полуколичественным методом оценки интенсивности окрашивания препарата (реакция выраженная – (+++); реакция умеренно выраженная – (++) ; выражена слабо – (+)).

Статистический анализ данных осуществляли с применением программ Microsoft Excel 2000 и STATISTICA 10.0, а также программного обеспечения GraphPad Prism (San Diego, California, USA). Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли как медиану (Me) и интерквартильный интервал [25%; 75%]. U-критерий Манна-Уитни использовался для определения значимости различий между независимыми образцами. Статистические гипотезы были проверены на уровне критической значимости 5% ($p < 0,05$).

Результаты

Введение стрептозоцина сопровождалось пятикратным повышением уровня сахара в крови экспериментальных животных (для сравнения, в контроле этот показатель составил $5,7 \pm 1,1$ ммоль/л, $p < 0,05$), глюкозурией, кетонурией, увеличением уровня гликозилированного гемоглобина, а также снижением массы тела экспериментальных животных на 19% при низком уровне выживаемости крыс, составляющем 70%.

Адренореактивность изолированного кольца аорты

В группе «Контроль» исходное напряжение кольца аорты составляло 1918 ± 37 мг. Дозозависимое (от 10^{-15} до 10^{-6} М) добавление фенилэфрина в раствор Кребса-Хензелята сопровождалось постепенным приростом напряжения. В группе «Контроль» прирост напряжения изолированного сегмента определялся при концентрации адреностимулятора, составлявшей 10^{-13} М, причем этот прирост составлял 15% от исходного напряжения. Максимальный констрикторный эффект – 94% (от исходного напряжения) – отмечался при концентрации фенилэфрина в ванночке, составлявшей 10^{-6} М.

Добавление высокоселективного ингибитора iNOS S-MT в раствор для перфузии колец аорты, изолированных из организмов контрольных

животных, не оказало воздействия на адренергическую вазоконстрикцию сегмента аорты. Этот факт указывает на то, что в контроле основная роль в регуляции тонуса кольца аорты принадлежит эндотелиальной, но не индуцибельной NO-синтазе. В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом исходное напряжение кольца аорты составляло 1920 ± 30 мг, что было сопоставимо с контрольным уровнем исходного напряжения. В группе животных «Сахарный диабет» начальное сокращение аортального сегмента фиксировалось при концентрации $\alpha 1$ -адреностимулятора, составлявшей 10^{-12} М. Максимальный прирост напряжения препарата кольца аорты наблюдался при концентрации фенилэфрина 10^{-6} М и составлял 77% от исходного напряжения ($p < 0,05$, что было на 17% меньше, чем в контроле, рис. 1). Следовательно, в группе «Сахарный диабет» реакция кольца аорты

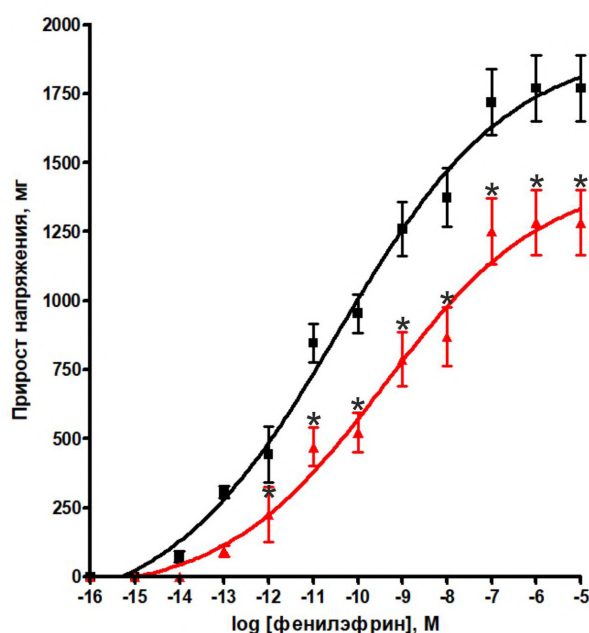


Рисунок 1 – Изменение адренореактивности изолированных колец аорты крыс, вызванной фенилэфрином, при экспериментальном сахарном диабете: по оси абсцисс – отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат – прирост сокращения изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации фенилэфрина; ■ – группа «Контроль»; ▲ – группа «Сахарный диабет». При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM); * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

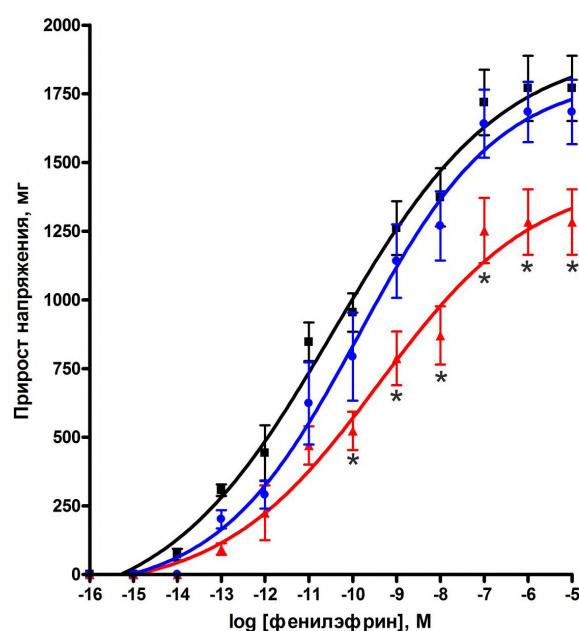


Рисунок 2 – Влияние S-метилизотиомочевина на изменение адренореактивности колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом: по оси абсцисс – отрицательный логарифм концентрации фенилэфрина, по оси ординат – прирост сокращения изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном введении в перфузионный раствор фенилэфрина. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM); ■ – группа «контроль»; ● – группа «Сахарный диабет»; ▲ – группа «Сахарный диабет+S-MT»; * – $p < 0,05$, по сравнению с группой «контроль».

Таблица 1 – Чувствительность препаратов аорты к фенилэфрину при экспериментальном сахарном диабете

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
«Контроль» (n=7)	3,66×10 ⁻¹¹	2,34 – 5,70×10 ⁻¹¹
«Сахарный диабет» (n=7)	2,10×10 ^{-10*}	2,10 – 7,17×10 ⁻¹⁰

Примечание: * – p=0,003 по сравнению с контролем; n – количество животных в группе; CI 95% EC₅₀ – уровень надежности 95%.

Таблица 2 – Влияние S-метилизотиомочевина на изменение чувствительности колец аорты к фенилэфрину в группе животных с экспериментальным сахарным диабетом

Группа животных	EC ₅₀ , М	CI 95% EC ₅₀ , М
«Контроль+S-MT» (n=7)	6,75×10 ⁻¹¹	4,46×10 ⁻¹¹ – 1,02×10 ⁻¹⁰
«Сахарный диабет+S-MT» (n=7)	3,88×10 ^{-10*}	2,10 – 7,17×10 ⁻¹⁰

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; n – количество животных в группе; CI 95% EC₅₀ – уровень надежности 95%.

на фенилэфрин была менее выражена, по сравнению с контролем. После продолжительной гипергликемии адреночувствительность изолированного сегмента аорты уменьшалась, по сравнению со значениями этого показателя в группе «Контроль» (табл. 1).

Введение в ванночку S-MT при перфузии колец аорты, выделенных из организмов животных с экспериментальным сахарным диабетом, сопровождалось начальной констрикторной реакцией препарата аорты на α1-адреностимулятор при его концентрации, составлявшей 10⁻¹²М. Максимальный прирост напряжения, вызванный введением в раствор для перфузии фенилэфрина, фиксировался при его концентрации 10⁻⁶М и составил 93% от исходного напряжения (данные были сопоставимы с контрольными показателями до блокады iNOS, рис. 2).

Концентрация фенилэфрина, вызывающая полумаксимальное сокращение препаратов аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом была такой же, что и до блокады iNOS (табл. 2). Следовательно, S-метилизотиомочевина полностью предупреждала снижение адренореактивности изолированных сегментов аорты животных группы «Сахарный диабет».

Эндотелийзависимая дилатация изолированного сегмента аорты

В группе «Контроль» эндотелийзависимая дилатация сегмента аорты развивалась при концентрации ацетилхолина 3×10⁻⁸М и составляла 12% от исходного сокращения кольца, вызванного фенилэфрином в концентрации 10⁻⁶М. При

добавлении в раствор Кребса-Хензелята ацетилхолина в концентрации 3×10⁻⁵М наблюдалась максимальная релаксация кольца аорты, которая составляла 60% от исходного предсокращения, вызванного фенилэфрином.

Введение в раствор для перфузии колец аорты, выделенных из организмов контрольных животных, S-метилизотиомочевина не влияло на выраженность эндотелийзависимой дилатации препарата аорты.

В препаратах колец аорты, выделенных из организмов животных с экспериментальным сахарным диабетом, релаксация сегмента аорты начиналась при той же концентрации ацетилхолина, что и в группе «Контроль» (при 3×10⁻⁸М) и составляла 19% от исходного сокращения препарата. При концентрации ацетилхолина 3×10⁻⁵М наблюдалась максимальная дилатация сегмента аорты, которая составляла 81% от сокращения сегмента аорты, вызванного фенилэфрином в концентрации 10⁻⁶М (p<0,05, что на 21% больше, чем в контроле, рис. 3).

Добавление S-метилизотиомочевина в раствор Кребса-Хензелята предупредило снижение выраженности эндотелийзависимой, опосредованной ацетилхолином, дилатации сегмента аорты, выделенной из организма животных с экспериментальным сахарным диабетом. Начальная релаксация кольца аорты фиксировалась при концентрации ацетилхолина в ванночке, составлявшей 3×10⁻⁸М. Максимальная релаксация составляла 60% от исходного предсокращения фенилэфрином и наблюдалась при концентрации ацетилхолина в растворе для перфузии 3×10⁻⁵М

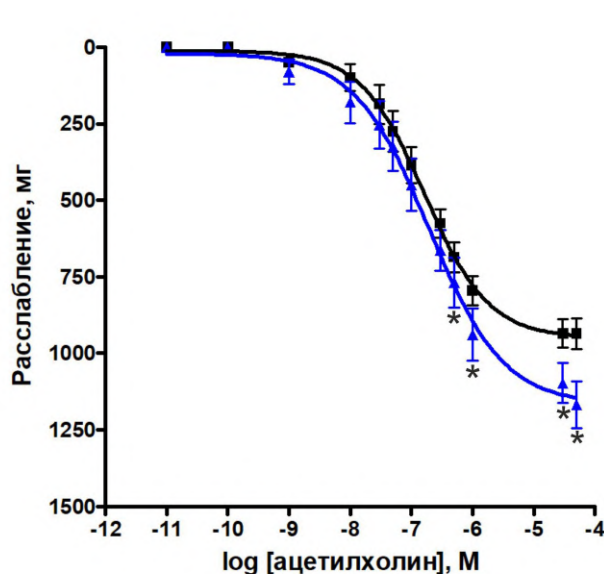


Рисунок 3 – Эндотелийзависимая вазодилатация колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом: по оси абсцисс – отрицательный логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – расслабление изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации ацетилхолина. При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM);
 ■ – группа «Контроль»;
 ▲ – группа «Сахарный диабет»;
 * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

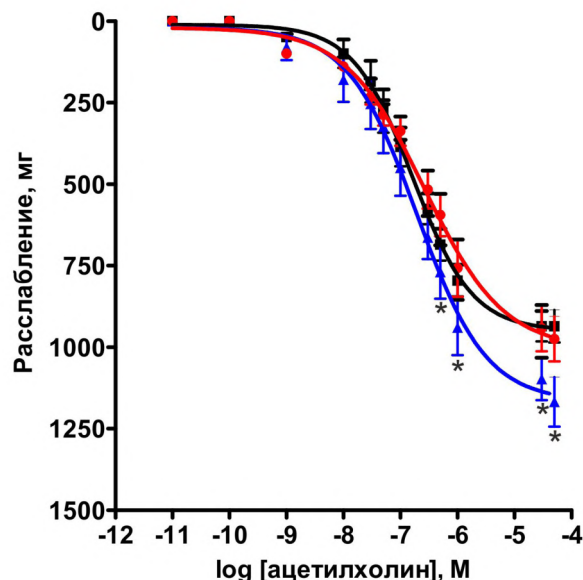


Рисунок 4 – Влияние S-метилизотиомочевин на изменение эндотелийзависимой вазодилатации колец аорты, изолированных из организмов крыс с экспериментальным сахарным диабетом: по оси абсцисс – отрицательный логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – расслабление изолированного кольца аорты крыс при кумулятивном увеличении концентрации ацетилхолина; ■ – группа «Контроль»; ▲ – группа «Сахарный диабет»; ● – группа «Сахарный диабет+S-MT». При построении графика величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me) и стандартной ошибки средней величины (SEM);
 * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

Таблица 3 – Чувствительность препаратов колец аорты к ацетилхолину при экспериментальном сахарном диабете

Группа животных	EC_{50} , М	CI 95% EC_{50} , М
«Контроль» (n=7)	$1,57 \times 10^{-7}$	$1,57 - 1,71 \times 10^{-7}$
«Сахарный диабет» (n=7)	$1,94 \times 10^{-7}$	$1,77 - 2,13 \times 10^{-7}$

Примечание: n – количество животных в группе; CI 95% EC_{50} – уровень надежности 95%.

Таблица 4 – Влияние S-метилизотиомочевин на изменение чувствительности препаратов колец аорты к ацетилхолину в группе животных с экспериментальным сахарным диабетом

Группа животных	EC_{50} , М	CI 95% EC_{50} , М
«Контроль+S-MT» (n=7)	$1,51 \times 10^{-7}$	$1,45 - 1,58 \times 10^{-7}$
«Сахарный диабет+S-MT» (n=7)	$2,62 \times 10^{-7}$	$2,30 - 3,00 \times 10^{-7}$

Примечание: n – количество животных в группе; CI 95% EC_{50} – уровень надежности 95%.

(значения были сопоставимы с данными контрольной группы, рис. 4). Концентрация ацетилхолина, вызывающая полумаксимальную дилатацию препарата аорты, не отличалась от таковой при изучении эндотелийзависимой вазодилатации

кольца аорты контрольных крыс (табл. 3, 4).

При иммуногистохимическом исследовании препаратов сегмента аорты крыс группы «Контроль» было установлено, что изоформа eNOS локализовалась в эндотелии, а также в

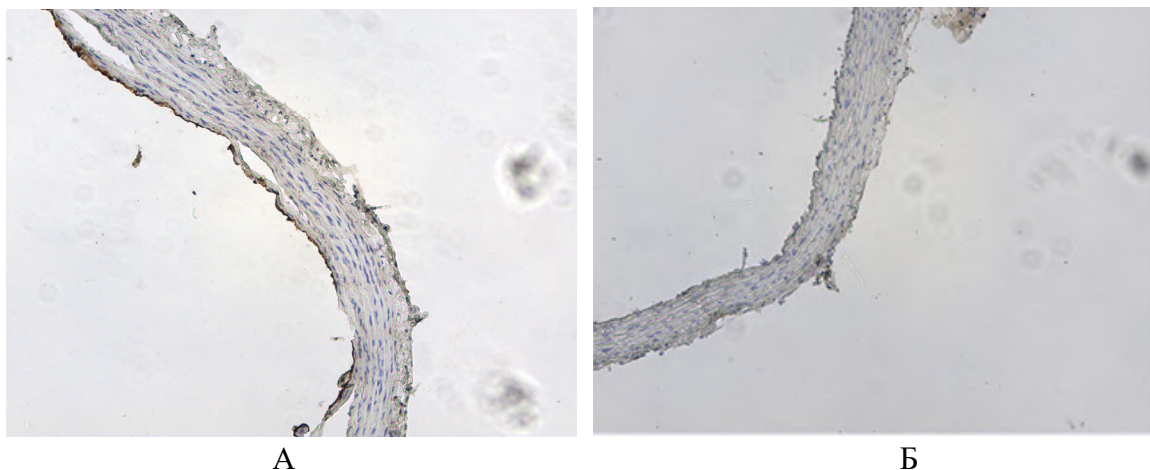


Рисунок 5 – Экспрессия эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы в образцах аорты крыс контрольной группы животных: экспрессия eNOS (А) в образцах аорты крыс группы «Контроль»; (Б) iNOS – группы «Контроль». Окраска Anti-enos antibody (А) и Anti-iNOS antibody (Б). Увеличение 100. Показанные изображения являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов с аналогичными результатами.

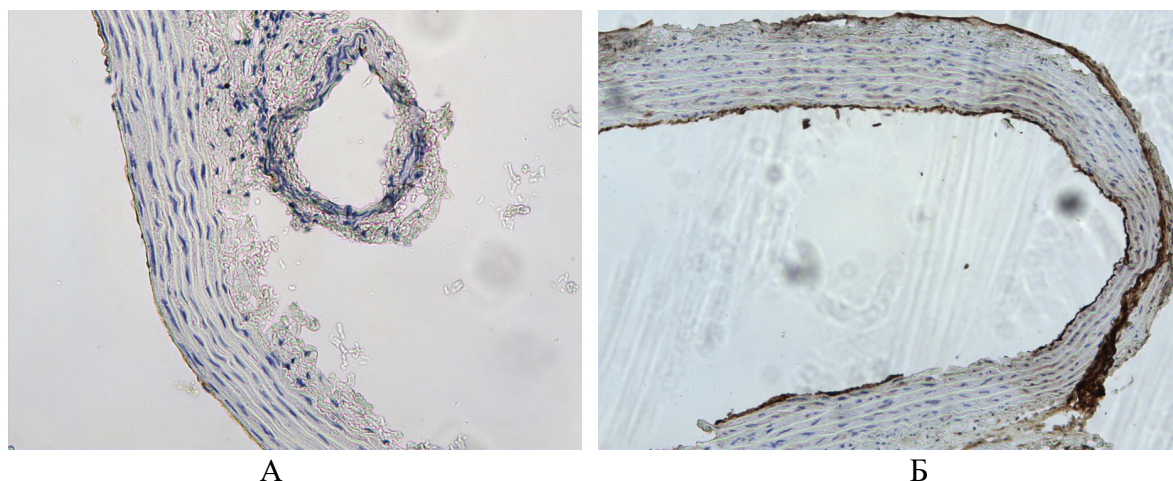


Рисунок 6 – Экспрессия эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS) NO-синтазы в образцах аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом: экспрессия eNOS (А) в образцах аорты крыс группы «Сахарный диабет»; (Б) iNOS – группы «Сахарный диабет». Окраска Anti-enos antibody (А) и Anti-iNOS antibody (Б). Увеличение 200. Показанные изображения являются репрезентативными для 5 независимых экспериментов с аналогичными результатами.

гладких миоцитах и адвентиции сосуда. Причем наиболее выраженное присутствие этой изоформы NO-синтазы было выявлено в эндотелиальных клетках (рис. 5А). Экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы в сегменте аорты контрольных крыс не наблюдалось (рис. 5Б).

Экспериментальный сахарный диабет сопровождался снижением экспрессии eNOS в эндотелии аорты, в гладкомышечных клетках аорты и ее наружной оболочке (рис. 6А). Напротив, экспрессия индуцибельной NO-синтазы в аорте крыс группы «Сахарный диабет» была наиболее выражена в эндотелиальном и адвентициальном слое аорты, в то время как при иммуногистохи-

мическом окрашивании к iNOS в гладкомышечных клетках аорты и отдельных ядрах миоцитов реакция была слабой (рис. 6Б).

Обсуждение

Таким образом, нами обнаружено, что экспериментальный сахарный диабет приводит к нарушению локальной регуляции тонуса аорты – сосуда эластического типа. Продолжительная гипергликемия оставляет «следы» на препарате изолированного кольца аорты в виде усиления ацетилхолин-индуцированной вазодилатации и ослабления вазоконстрикции, вызван-

ной фенилэфрином. Такие изменения способны привести к явлению гиперперфузии миокарда изолированного сердца крыс при сахарном диабете, вызванном введением стрептозоцина [5] с последующим отеком миокарда и развитием диастолической дисфункции. На основании обнаруженных нами фактов, свидетельствующих об устранении нарушения адренореактивности и эндотелийзависимой вазодилатации препаратов колец аорты, выделенных из организмов крыс с сахарным диабетом посредством добавления в перфузионный раствор селективного ингибитора iNOS S-метилизотиомочевина, можно утверждать, что гиперпродукция оксида азота индуцибельной NO-синтазой является важной причиной нарушения механизмов локальной регуляции тонуса аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Более того, это утверждение подтверждается и фактом обнаружения iNOS в эндотелии аорты таких животных при иммуногистохимическом исследовании. Повышение активности iNOS в эндотелии аорты может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, провоспалительные цитокины, в том числе интерлейкин 1 β , содержание которого повышается в плазме крови экспериментальных животных с сахарным диабетом [6], способны увеличивать количество мРНК iNOS. Во-вторых, активность iNOS увеличивается под влиянием конечных продуктов гликозилирования белков [7], повышение содержания которых у крыс с экспериментальным сахарным диабетом было обнаружено и нами. В-третьих, под влиянием активных форм кислорода повышается активность этого фермента. Zhu M. и соавт. показали, что при инкубации культуры эндотелиоцитов, выделенных из пупочной вены, в среде с высоким содержанием в ней глюкозы, увеличивается образование в этих клетках супероксидного радикала [8]. В условиях стойкой гипергликемии индуцибельная NO-синтаза сама по себе может продуцировать не только NO в больших количествах, но и супероксидный радикал [9], т.е. происходит «разобщение iNOS», а образующиеся активные формы кислорода не только инициируют ПОЛ [9], но и нарушают структуру кавеол с последующим снижением образования NO эндотелиоцитарной изоформой NO-синтазы. Более того, окислительный стресс может привести к уменьшению количества α 1-адренорецепторов в сосудистой стенке. Так, в экспериментах, выполненных на мезентериальных сосудах кролика, Т. Murata и соавторами было продемонстрировано, что при хроническом

токсическом воздействии на мезентериальные сосуды доксорубицина образующийся супероксидный радикал играет важную роль в уменьшении количества α 1-адренорецепторов [10]. Таким образом, системное воспаление низкой интенсивности и окислительный стресс, неизбежно сопровождающие стойкую гипергликемию при сахарном диабете, способствуют стимуляции и активации индуцибельной NO-синтазы с последующим нарушением баланса между вазоконстрикторными и вазодилаторными реакциями кровеносных сосудов.

Заключение

Полученные данные позволяют констатировать, что экспериментальный сахарный диабет сопровождается гиперэкспрессией индуцибельной NO-синтазы при сниженной экспрессии eNOS в эндотелии аорты.

Усиление эндотелийзависимого расслабления и снижение адренореактивности препарата кольца аорты при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете во многом определены активацией индуцибельной NO-синтазы.

Последующее изучение адренореактивности сосудов сердца может иметь важное значение в выработке новой терапевтической стратегии, направленной на предотвращение и коррекцию сосудистых осложнений сахарного диабета.

Литература

1. Gewaltig, M. T. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential / M. T. Gewaltig, G. Kojda // *Cardiovasc. Res.* – 2002 Aug. – Vol. 55, N 2. – P. 250–260.
2. Orlando, G. F. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice / G. F. Orlando, G. Wolf, M. Engelmann // *Amino Acids.* – 2008 Jun. – Vol. 35, N 1. – P. 17–27.
3. Reduced nitric oxide-mediated relaxation and endothelial nitric oxide synthase expression in the tail arteries of streptozotocin-induced diabetic rats / S. S. Mokhtar [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016 Feb. – Vol. 773. – P. 78–84.
4. Лазуко, С. С. Роль индуцированной NO-синтазы в эндотелий-зависимой регуляции тонуса артериальных сосудов при адаптации короткими стрессорными воздействиями / С. С. Лазуко, А. П. Солодков, К. А. Шилин // *Вестн. ВГМУ.* – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 44–49.
5. Lazuko, S. S. Functional activity of BKCa channels in coronary vascular smooth muscle cells during combined exposure to hyperglycemia and stress / S. S. Lazuko, A. P. Solodkov, S. S. Skrinaus // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2014 Jan. – Vol. 156, N 3. – P. 310–316.
6. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and

function in diabetes / E. Rendra [et al.] // Immunobiology. – 2018 Dec. – Pii: S0171-2985(18)30213-4.

7. Sumi, D. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in advanced glycation end product-stimulated RAW 264.7 cells: the role of heme oxygenase-1 and endogenous nitric oxide / D. Sumi, L. J. Ignarro // Diabetes. – 2004 Jul. – Vol. 53, N 7. – P. 1841–1850.
8. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells / M.

Zhu [et al.] // Anesth. Analg. – 2012 Feb. – Vol. 114, N 2. – P. 303–309.

9. Inhibition of nitric oxide synthase uncoupling by sepiapterin improves left ventricular function in streptozotocin-induced diabetic mice / H. Jo [et al.] // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2011 Aug. – Vol. 38, N 8. – P. 485–493.
10. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery / T. Murata [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2001 Apr. – Vol. 132, N 7. – P. 1365–1373.

Поступила 25.01.2019 г.

Принята в печать 25.03.2019 г.

References

1. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. Cardiovasc Res. 2002 Aug;55(2):250-60.
2. Orlando GF, Wolf G, Engelmann M. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. Amino Acids. 2008 Jun;35(1):17-27. doi: 10.1007/s00726-007-0630-0
3. Mokhtar SS, Vanhoutte PM, Leung SW, Suppian R, Yusof MI, Rasool AH. Reduced nitric oxide-mediated relaxation and endothelial nitric oxide synthase expression in the tail arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. Eur J Pharmacol. 2016 Feb;773:78-84. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.013
4. Lazuko SS, Solodkov AP, Shilin KA. The role of induced NO-synthase in endothelium-dependent regulation of arterial vessel tone in adaptation to short stressors. Vestn VGMU. 2013;12(4):44-9. (In Russ.)
5. Lazuko SS, Solodkov AP, Skrinaus SS. Functional activity of BKCa channels in coronary vascular smooth muscle cells during combined exposure to hyperglycemia and stress. Bull Exp Biol Med. 2014 Jan;156(3):310-6. doi: 10.1007/s10517-014-2337-z

6. Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. Immunobiology. 2018 Dec. pii: S0171-2985(18)30213-4. doi: 10.1016/j.imbio.2018.11.010
7. Sumi D, Ignarro LJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in advanced glycation end product-stimulated RAW 264.7 cells: the role of heme oxygenase-1 and endogenous nitric oxide. Diabetes. 2004 Jul;53(7):1841-50.
8. Zhu M, Chen J, Tan Z, Wang J. Propofol protects against high glucose-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. Anesth Analg. 2012 Feb;114(2):303-9. doi: 10.1213/ANE.0b013e31823f0c42
9. Jo H, Otani H, Jo F, Shimazu T, Okazaki T, Yoshioka K, et al. Inhibition of nitric oxide synthase uncoupling by sepiapterin improves left ventricular function in streptozotocin-induced diabetic mice. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2011 Aug;38(8):485-93. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05535.x
10. Murata T, Yamawaki H, Hori M, Sato K, Ozaki H, Karki H. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. Br J Pharmacol. 2001 Apr;132(7):1365-73. doi: 10.1038/sj.bjp.0703959

Submitted 25.01.2019

Accepted 25.03.2019

Сведения об авторах:

Лазуко С.С. – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Медведев М.Н. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Беляева Л.Е. – к.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Lazuko S.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor; head of the Chair of Normal Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Medvedev M.N. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Pathologic Anatomy with the course of Forensic Medicine, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Belyaeva L.E. – Candidate of Medical Sciences, associate professor; head of the Chair of Pathologic Physiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра нормальной физиологии. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Лазуко Светлана Степановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Normal Physiology. E-mail: Lazuko71@mail.ru – Svetlana S. Lazuko.